

令和 3 年 6 月 10 日現在

機関番号：13801

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K06016

研究課題名(和文)精子機能に重要なSLC輸送体研究の展開：創薬や受精能獲得機構の解明に向けて

研究課題名(英文) Development of research on SLC transporters important for sperm function: Toward drug discovery and elucidation of the mechanism of fertility acquisition

研究代表者

与語 圭一郎 (Keiichiro, Yogo)

静岡大学・農学部・准教授

研究者番号：60362844

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：マウスSlc22a14は精子特異的に発現するオーファントランスポーターで、この遺伝子を欠損したマウスは精子の運動能や受精能が極端に低下する。本研究では、Slc22a14の輸送基質の同定やSlc22a14欠損精子において受精能獲得が低下するメカニズムの解析を試みた。輸送基質の同定については、Slc22a14を発現させた293細胞によるRI標識基質の取り込み実験やメタボローム解析などを行ったが同定には至らなかった。一方、Slc22a14欠損マウス精子において受精能獲得が低下するメカニズムについては、受精能獲得の最上流にある重炭酸イオンの流入に問題があることをつきとめた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

哺乳類の精子が受精するためには「受精能獲得」と呼ばれる機能的な変化が必須である。これまでの研究から、受精能獲得は重炭酸ナトリウムイオンの流入をきっかけに、種々の細胞内シグナル伝達となることが分かっているが、トリガーとなる重炭酸ナトリウムイオンの輸送体の実態やその調節機構については不明な点が多い。本研究では、Slc22a14という有機酸トランスポーターファミリーのメンバーが重炭酸イオンの流入に必要であることを見出した。この結果は、受精能獲得機構の解明に役立つものである。

研究成果の概要(英文)：Mouse Slc22a14 is an orphan transporter specifically expressed in spermatozoa, and mice lacking Slc22a14 show significantly decreased sperm motility and fertilizing ability. In this study, we tried to identify the transport substrate of Slc22a14 and investigated the mechanism for the reduced capacitation ability of Slc22a14-KO sperm. Although we investigated the incorporation of various RI-labeled substances using Slc22a14 expressing 293 cells or metabolomic analysis using WT and KO sperm, we could not identify the transport substrate. On the other hand, we identified the influx of HCO₃⁻ into sperm, a trigger of sperm capacitation, is impaired in Slc22a14-KO sperm.

研究分野：生殖生物学

キーワード：マウス 精子 受精能獲得 トランスポーター

1. 研究開始当初の背景

日本では6~7組に1組の夫婦が不妊であり、その約半数は男性側に起因している。男性不妊の原因は、精子分化・機能に関わる遺伝子の機能不全であると考えられるが、男性不妊の原因遺伝子や正常な精子分化・機能を支える分子基盤は不明な点が多い。一方、既存の避妊法が存在するにもかかわらず、いまだ世界人口は増加を続けていることや、食害や生態系破壊をもたらす野生動物が増加していることからヒトや動物の新しい避妊/繁殖制御技術の開発も望まれている。

このような背景のもと、研究代表者は雄マウスの生殖能に重要な遺伝子として Solute carrier (Slc) 22a14 を見出した。Slc22a14 は、精子特異的に発現する有機アニオン/カチオントランスポーターファミリーのメンバーであり、本遺伝子の欠損マウスは、精子分化そのものは正常であるが、精巣上体を通過中に精子の鞭毛が異常屈曲し、運動能が低下する。また、卵と受精するために必要な精子の機能変化である受精能獲得能力も顕著に低下する。これらの精子機能の低下が重なり、Slc22a14 を欠損した雄の生殖能力は著しく低下する。

このような生理的重要性や膜表面に局在する有利性から、SLC22A14 はヒトや動物の生殖制御に向けた有望な創薬標的因子である。しかし、輸送基質が不明なため、医薬品探索に必要な機能評価系が存在しない。さらに、Slc22a14 欠損マウス精子の特徴は、精子無力症や精子奇形症といったヒト不妊症精子の特徴と一致すること、また、ヒト SLC22A14 遺伝子には多くの一塩基多型 (SNP) が存在することなどから、SLC22A14 はヒト男性不妊の潜在的な原因遺伝子であると示唆される。しかし、ヒトにおいては SLC22A14 の発現・局在などの基本的知見が不足しているほか、SNP と機能の関係も不明であり、男性不妊との直接的な関係は明らかになっていない。また、Slc22a14 欠損マウス精子で生じる鞭毛の異常屈曲は、溶質輸送の異常が引き起こす浸透圧性細胞膨張が主な原因であることが分かった。しかし、Slc22a14 の欠損により、なぜ受精能獲得に異常が生じるのか、そのメカニズムについては明らかになっていない。

2. 研究の目的

以上のような背景から、本研究では次の点を解明することを目的に研究を行った。

- (1) SLC22A14 の輸送基質の同定と基質輸送の生化学的特性の解明
- (2) ヒト SLC22A14 の発現・機能に関する基礎的知見の収集と輸送機能と関連する SNP の同定
- (3) Slc22a14-KO 精子が受精能獲得不全を引き起こすメカニズムの解明

3. 研究の方法

- (1) SLC22A14 の輸送基質の同定と基質輸送の生化学的特性の解明

SLC22A14 発現 293 細胞あるいは SLC22A14 mRNA を注入したアフリカツメガエル卵を用いて RI 標識した基質候補物質を取り込むかどうか解析する。また取り込みがみられた場合は、基質親和性、基質輸送速度などを計測するほか、当該物質の野生型・Slc22a14 欠損マウス精子内濃度を計測する。

- (2) ヒト SLC22A14 の発現・機能に関する基礎的知見の収集と輸送機能と関連する SNP の同定

市販のヒト組織 cDNA を用いて、どの組織に SLC22A14 が発現しているのか PCR にて解析する。また、抗ヒト SLC22A14 抗体を作製して、タンパク質レベルでの精巣内での発現パターン、細胞内局在などを調べる。項目(1)で得られた知見を基に、データベース上に登録されている SLC22A14 の SNP が輸送機能にどのような影響を及ぼすのか解析する。

- (3) Slc22a14-KO 精子が受精能獲得不全を引き起こすメカニズムの解明

KO 精子において受精能獲得のシグナル伝達のどの過程に障害が生じているのかを生化学的手法を用いて解析する。また、野生型精子と Slc22a14-KO 精子の間で発現が変化しているタンパク質を網羅的に解析する。

4. 研究成果

- (1) SLC22A14 の輸送基質の同定と基質輸送の生化学的特性の解明

FLAG-タグ付加ヒト SLC22A14 発現ベクターを作成し、293 細胞に導入後、SLC22A 輸送体ファミリーのモデル基質であるパラアミノ馬尿酸およびテトラエチルの取り込みを調べたが取り込みは認められなかった。また SLC22A14 発現アフリカツメガエル卵を用い、さらに多くの輸送基質候補物質の取り込みを調べたが、同様に取り込みは認められなかった。293 細胞において発現させた SLC22A14 の局在を調べたところ、大部分は細胞質にとどまっている様子が伺えた。発現量が高すぎて細胞膜への輸送が阻害されている可能性を考え、プロモーターの異なる発現ベクターも試したが同様の結果であった。SLC22A14 の細胞膜への局在には精子特異的に発現する足場タンパク質が必要である可能性がある。あるいは SLC22A14 の他のファミリーにはそのような輸

送体は知られていないが、細胞内で働く輸送体という可能性も考えられる。

次に、輸送基質の同定を行うため野生型マウス精子と KO マウス精子の代謝産物のメタボローム解析を行うことを考えた。そこで、学外の質量分析センターの協力を得て、解析に必要な精子数等の条件検討を行った。その結果、かなりの数のマウスが必要なることがわかり、当研究室の規模では必要なマウス数を準備するのが困難であることが判明した。

(2) ヒト SLC22A14 の発現・機能に関する基礎的知見の収集と輸送機能と関連する SNP の同定

ヒトの各組織 cDNA を鋳型に SLC22A14 の発現を PCR によって解析した。その結果、SLC22A14 はヒトにおいてもマウスと同様に精巢特異的に発現していることが分かった。次に、タンパク質レベルでの解析を行うため、市販されている抗ヒト SLC22A14 抗体を購入し、FLAG タグ付加 SLC22A14 強制発現系を用いて性能の検証を行った。しかしウエスタンブロットでは、コントロールの FLAG 抗体では検出できたシグナルが市販抗体ではほとんど検出できず、また非特異バンドが多くみられた。そこで、独自に抗体を作製することとした。

ヒト SLC22A14 の部分ペプチドをウサギに免疫し、アフィニティー精製した抗体を得た。いくつかの部位に対する抗体作成を行ったが、FLAG タグ付加 SLC22A14 発現 293 細胞抽出液を用いた検証実験において最も強く抗原を認識したのは C 末端領域を抗原とした抗体であった。この抗体を用いて、ヒト精子の SLC22A14 をウエスタンブロットで検出しようと試みたが、予想分子量より 20kD ほど大きい位置にシグナルが検出された。糖鎖修飾により電気泳動における移動度が変化したのではないかと推測したが、グリコシダーゼ処理の有無によりバンドの位置は変化しなかった。一方、同抗体を用いてヒト精子の免疫染色を行い、細胞内局在を解析したところ、マウスでの細胞内局在と同じく鞭毛主部にシグナルが認められた。このように本抗体の特異性に関しては、本当に SLC22A14 を認識しているのかどうか十分な確証が得られなかった。

NCBI データベースにはヒト SLC22A14 の SNP が多数報告されている。また、新たなストップコドンの出現により大きくタンパク質が欠損する SNP の存在も論文で報告されている。当初これらの SNP が SLC22A14 の機能に及ぼす影響を項目(1)で明らかにした輸送基質の取り込み実験で解明する予定であったが、基質同定には至らなかったため、この研究項目については実施できなかった。

(3) Slc22a14-KO 精子が受精能獲得不全を引き起こすメカニズムの解明

Slc22A14-KO マウス精子は、通常の条件で培養を行っても受精能獲得の指標であるタンパク質のチロシンリン酸化レベルの上昇が観察されない。受精能獲得は、重炭酸イオンの流入をきっかけに、重炭酸イオン依存性アデニル酸シクラーゼの活性化 細胞内 cAMP 濃度の上昇 プロテインキナーゼ A (PKA) の活性化 チロシンキナーゼの活性化というシグナル伝達を経ることが知られている。本研究では、まずこの過程のどこが障害されているかを調べた。まず受精能獲得条件での cAMP 産生を調べたところ、野生型に比べ KO 精子では顕著に産生量が低下していた。次に、野生型および KO 精子における重炭酸イオン依存性アデニル酸シクラーゼの活性を *in vitro* で調べた結果、両者に差がないことが分かった。また、細胞透過性 cAMP を KO 精子に添加したところ、野生型と同レベルまで細胞内のチロシンリン酸化レベルが上昇した。これらの結果から、KO 精子においては重炭酸イオンの流入に障害が起きていることが示唆された。そこで受精能獲得前後における細胞内 pH(pHi)を解析した。その結果、重炭酸イオンを添加する前においても KO 精子の pHi は野生型に比較して顕著に低く、また重炭酸イオンを添加しても野生型と異なり pHi は上昇しなかった。以上の結果より、Slc22a14-KO 精子においては、重炭酸イオンの輸送あるいはプロトンの輸送に障害があることが示唆された。

この原因を明らかにすべく、まず精巣や精子で発現することが知られている重炭酸イオンならびにプロトン輸送に関わる 7 つの輸送体の精巣における発現量を半定量 RT-PCR 法で解析した。しかしながら、いずれの輸送体においても野生型と KO 精巣の間で差は認められなかった。また、受精能獲得に関わることが知られている二つの重炭酸イオントランスポーターについて精子における発現をウエスタンブロットにより調べたが WT と KO で差は認められなかった。そこで iTRAQ により野生型マウス精子と KO 精子の網羅的なタンパク質発現比較解析を行った。その結果、発現量に差がある重炭酸イオン/プロトントランスポーターは同定できなかったが、TMEM225 などいくつかのタンパク質発現が KO 精子において低下していることが明らかとなった。TMEM225 は精子特異的に発現する分子で、タンパク質脱リン酸化酵素 PP1 の働きを阻害する活性を持つことが報告されている。また、国際的なノックアウトマウス表現型解析コンソーシアムである IMPC において、本遺伝子はオスの生殖能に必須であるとのデータが出ている。従って、この分子の発現低下が Slc22a14 KO マウスにおける受精能獲得能の低下に関与している可能性も考えられ、今後 TMEM225 が受精能獲得に関係しているのかが調べていく必要がある。

また、我々は 293 細胞における発現系において、ある特定のプロトントランスポーターや重炭酸イオントランスポーターと結合することを見出した。これら分子の結合の機能的な意義については不明であるが、Slc22a14 の欠損により、それら輸送体の機能が低下する可能性も考えられ、Slc22a14-KO マウスにおける受精能獲得能低下の主要因であるかもしれない。今後の研

究課題としたい。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 宇納真人, 樋口俊哉, 宗修平, 伊藤昌彦, 与語圭一郎
2. 発表標題 Slc22a14欠損精子において受精能獲得が低下する機構の解析
3. 学会等名 第112回日本繁殖生物学会大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 室井智之, 松島有里, 金森涼太, 井上ひかり, 藤井涉, 与語圭一郎
2. 発表標題 GPR62のシグナル伝達経路と遺伝子欠損が生殖能力に及ぼす影響の解析
3. 学会等名 日本繁殖生物学会
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	安西 尚彦 (Anzai Naohiko) (70276054)	千葉大学・大学院医学研究院・教授 (12501)	
研究分担者	永森 収志 (Nagamori Shushi) (90467572)	奈良県立医科大学・医学部・教授 (24601)	

6. 研究組織（つづき）

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	宗 修平 (So Shuhei) (30647607)	浜松医科大学・医学部・特任助教 (13802)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関